大鼠电子烟模型尿液蛋白质组学分析

刘禹卿[1]，沈梓芸[2]，赵晨阳[3]，高友鹤[1]*

[1]（北京师范大学 生命科学学院 基因工程药物及生物技术北京市重点实验室

北京 100875）

摘要：

本研究通过构建大鼠电子烟模型，在大鼠吸食电子烟的前、中、后期，即第 0、3、12、15、17 天分别收取尿液样本，从尿液蛋白质组学的角度对电子烟进行探究。为了排除个体差异的影响，实验采用单只大鼠前后对照进行分析，同时设置对照组以排除大鼠生长发育造成的差异。结果表明，在相同的条件下吸食电子烟后，大鼠产生的差异蛋白具有较强的个体差异性。我们在大鼠吸食电子烟的第 3 天产生的差异蛋白中，发现 6 只实验组大鼠前后对照中，有 5 只共同鉴定到了 COPD 的生物标志物胎球蛋白 B，以及被认定为多种肿瘤标志物的膜联蛋白 A2。本研究还发现了在嗅上皮有表达的气味结合蛋白在尿液蛋白质组中出现，并且显著上调，这或许有助于解释嗅觉的适应。我们还在产生的差异蛋白和富集到的信号通路中都发现了吸食电子烟影响大鼠免疫系统、心血管系统、呼吸系统等的证据，为进一步探究电子烟对人体的作用机制提供线索。

关键词：尿液，蛋白质组学，电子烟模型，气味结合蛋白

Urine proteomic analysis of rat e-cigarette model

Yuqing Liu[1] Ziyun Shen[2] Chenyang Zhao[3] Youhe Gao[1]*

[1](Gene Engineering Drug and Biotechnology Beijing Key Laboratory, College of Life Sciences，Beijing Normal University, Beijing 100871, China)

Abstract:

Urinary proteomics was used to investigate the potential effects of e-cigarettes on the human body. In this study, a rat e-cigarette model was constructed by smoking for two weeks and urine samples before, during, and after e-cigarette smoking were collected. Urine proteomes before-after smoking of each rat were compared individually, while the control group was set up to rule out differences caused by rat growth and development. After smoking, the differential proteins produced by rats shows strong individual variation. Fetuin-B, a biomarker of COPD, and annexin A2, which is recognized as a multiple tumor marker, were identified as the differential proteins in five out of six smoking rats on day 3. To our surprise, odorant-binding proteins expressed in the olfactory epithelium were also found and were significantly upregulated, which may help explain olfactory adaptation. Pathways enriched by the differential proteins shows the evidence that smoking e-cigarettes affects the immune system, cardiovascular system, respiratory system, etc., which provides clues for further exploration of the mechanism of e-cigarettes on the human body.

Keywords: urine; proteomics; e-cigarette model; odorant-binding protein

1. 前言

基金项目：国家重点研发计划课题（2018YFC0910202）；中央高校基本科研业务费专项资金（2020KJZX002)；北京师范大学（11100704）

作者简介：1.刘禹卿.（一作）（1999.12—），女，硕士研究生，主要研究方向：尿液生物标志物；2.沈梓芸.（二作）（1999.08—），女，硕士研究生，主要研究方向：尿液生物标志物；3.赵晨阳.（三作）（1998.03—），女，硕士研究生，主要研究方向：尿液生物标志物。

通信联系人：高友鹤（1964.06—），男，教授，博士生导师，主要研究方向：尿液蛋白质组学与尿液生物标志物.E-mail: gaoyouhe@bnu.edu.cn.

1.1 电子烟及其研究现状

电子烟主要由烟油、加热系统、电源和过滤嘴四部分组成，通过加热雾化产生具有特定气味的气溶胶供烟民使用。截至 2019 年，中国 15 岁及以上人群使用电子烟的人数约为 1000 万[1]。使用电子烟的人群以年轻人为主，15-24 岁年龄组的使用率最高[1]。绝大多数（58.3%）的中学生电子烟使用者使用水果味的电子烟，而先前的研究表明，这些口味可能会吸引年轻人去尝试电子烟[2]。2022 年 5 月 1 日，《电子烟管理条例》禁止使用除烟草口味以外的电子烟。Pipe AL[3]等人研究发现，电子烟雾化后人体吸入的加热化学气溶胶的成分十分复杂，包括尼古丁、亚硝胺、羰基化合物、重金属、自由基、活性氧类、颗粒物和“令人关注的新兴化学物质”等，这更加证明了吸食电子烟存在的潜在危害性。有研究表明，吸食电子烟可能会增加患有肺部疾病[4]、心血管疾病[5][6]的风险，同时可能会对肝脏[7]、泌尿系统[8]、免疫系统[9]等带来危害。吸食电子烟不仅会对自身造成危害，同时还可能对暴露于电子烟的孕妇中的胎儿造成伤害。Ballbè M 等人[10]在暴露于电子烟的非使用者孕妇的脐带血和母乳中检测到了低浓度但不可忽略的电子烟相关分析物。而 Aslaner DM[11]等人的研究也证明，孕妇吸入二手电子烟会对后代肺部产生长期的影响。同时，由于电子烟烟雾中的尼古丁含量与可燃烟含量相当，甚至更高[12]，其对人体造成的毒瘾伤害也不容忽视。

1.2 尿液生物标志物

生物标志物是能够从客观的角度去反映正常的病理过程以及生理过程的指示物[13]，在临床上，生物标志物能够在不同的阶段预测、监测和诊断多因素的疾病[14]。相较于目前应用更广泛的血液生物标志物，尿液生物标志物的潜能尚未开发完全。尤其是在疾病的早期诊断和状态预测方面。由于血液中存在内环境稳态机制的调节，由疾病导致的血液蛋白质组变化被代谢排出，不能在疾病早期显现明显的变化。而尿液是由肾小球过滤血浆产生的，不受稳态机制的调节，变化灵敏，疾病在早期的微小变化都能够在尿液中观察到。且在样本获取方面，尿液的获取更加无创、易得[15]，可见尿液是良好的生物标志物来源。

目前尿液中的生物标志物的检测越来越受到检验医师和研究者的关注，且已经被运用到多种疾病的治疗和研究中，如肺纤维化[16]、结肠炎[17]、神经胶质瘤[18]等疾病。有研究表明，尿液生物标志物可以对疾病进行分类，如预测慢性肾病(CDK)[19]、区分卵巢癌良恶性肿瘤[20]等。尿液生物标志物还可以用于检测肿瘤手术后是否切除完全，是否会复发，从而及时做出调整降低复发风险。在药理学方面，尿液生物标志物可以观测药物对机体的效用，如预测成年系统性红斑狼疮（SLE）患者对利妥昔单抗治疗的疗效、沙库巴曲缬沙坦比缬沙坦治疗慢性心力衰竭的效果更显著等[21]。在运动生理学方面，尿液生物标志物可以反应运动后尿液蛋白质组学的变化，从而为运动员的合理训练提供科学依据[22]。近年来，有许多研究表明，尿液蛋白质组学还可以在精神系统疾病中观测到生物标志物，如帕金森综合征[23、24]、阿尔兹海默症[25]、抑郁症[26]、自闭症[27]等疾病。

但目前在尿液蛋白质组学领域中尚未有关于电子烟的研究。由于尿液蛋白质组易受多种因素的影响，如饮食、药物治疗、日常活动等。要使实验结果更为准确，关键是采用简单且可控制的系统。由于动物模型的遗传和环境因素可以人为控制，能够最大程度减小无关因素的影响，采用动物模型是一种非常合适的实验方法。因此我们构建动物模型，对大鼠电子烟模型的尿液蛋白质组学进行分析，实验技术路线如图 1 所示。希望能寻找到吸食电子烟对于大鼠尿液蛋白质组的影响。

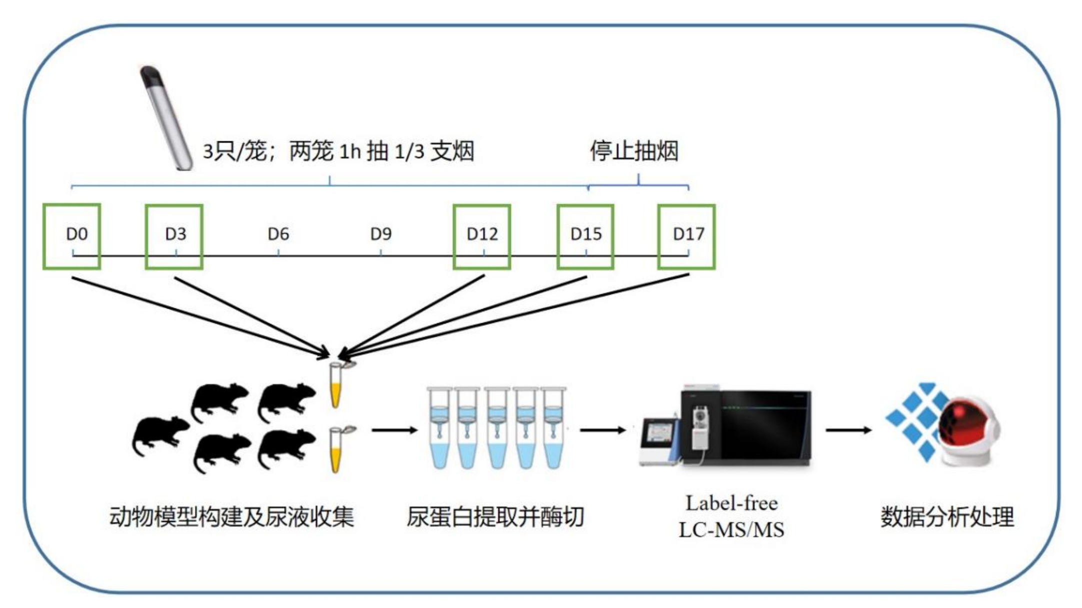


图 1 大鼠电子烟模型尿液蛋白质组学分析的技术路线

2. 材料与方法

2.1 建立电子烟动物模型

本实验选取 SPF 级 8 周龄健康雄性 Wistar 大鼠（180-200g）11 只，购于北京维通利华实验动物技术有限公司，动物许可证号为 SYXK(京)2021-0011。所有大鼠在标准环境中饲养（室温（22±1）℃，湿度 65%-70%）。将所有大鼠在新环境中饲养三天后开始实验，一切实验操作遵循北京师范大学生命科学学院伦理委员会的审查和批准。

电子烟动物模型建立方法如下：将 11 只大鼠随机分成实验组和对照组。其中 5 只对照组大鼠在标准环境中饲养 17 天。6 只实验组大鼠每天在同一时间段吸食 1 次电子烟，每次将 1/3 支 3%的尼古丁烟弹制作成烟雾（约 16 mg 尼古丁）均匀地注入两个笼中【36 厘米（长）×20 厘米（宽）×28 厘米（高）】，在保证含氧量充足的条件下，每笼放入 3 只实验组大鼠，放置 1 小时，持续吸食 14 天，在吸食结束后将它们放回自己的笼中。在实验过程中观察大鼠的行为变化，且每隔 5 天记录一次体重。

2.2 尿液样品的收集

将所有大鼠在新环境中饲养三天后，统一置于代谢笼中收集 12 h 的尿液样本。在大鼠吸食电子烟的第 3、6、9、12 天和停止吸食电子烟的第 1（即 Day15）、3（即 Day17）天，将全部大鼠置于代谢笼中收集 12 h 的尿液样本。在尿液收集过程中大鼠禁食禁水，收集的尿液样本都放入−80℃冰箱保存。

2.3 尿液样品的处理

由于我们想观察到尿液蛋白质组的灵敏程度，观测短时间吸食电子烟，大鼠机体的变化能否体现在尿液蛋白质组中。因此选取未抽烟的第 0 天，抽烟后第 3 天和第 12 天，以及停止抽烟的第 1 天和第 3 天作为本次重点分析的样本。

尿蛋白提取和定量：将 5 个时间点收集到的大鼠尿液样本在 4℃的条件下 12000×g 离心 40 min，将上清液转移到新的 EP（eppendorf）管中。加入三倍体积的预冷无水乙醇，均匀混合后在-20℃条件下沉淀过夜。第二天将混合液于 4℃，12000×g 离心 30 min，弃上清。将蛋白沉淀重悬于裂解液中(含 8 mol/L 尿素，2 mol/L 硫脲，25 mmol/L 二硫苏糖醇，50 mmol/L

Tris)。于 4℃条件下 12000×g 离心 30 min，取上清置于新的 EP 管内。用 Bradford 法测量蛋白质浓度。

尿蛋白酶切：取 100 μg 尿蛋白样品加入到 10 kDa 超滤管的滤膜(Pall, Port Washington, NY, USA)上，置于 EP 管中，加入 25 mmol/L NH_4HCO_3溶液使总体积为 200 μL。后加入 20 mM 二硫苏糖醇溶液（Dithiothreitol, DTT, Sigma），涡旋混匀后，金属浴 97℃加热 5 min，冷却至室温。加入 50 mM 的碘乙酰胺（Iodoacetamide, IAA, Sigma），混匀后室温避光反应 40 min。而后进行洗膜操作：①加入 200 μL UA 溶液(8 mol/L 尿素，0.1 mol/L Tris-HCl，pH 8.5)，按照 14000×g 5 min 18℃的条件离心洗涤两次；②上样：加入刚刚处理的样品，在 14000×g 40 min 18℃条件下进行离心；③加入 200 μL UA 溶液，18℃条件下按 14000×g 离心 40 min，重复两次；④加入 25 mmol/L NH4HCO3 溶液，在 14000×g 40 min 18℃条件下离心，重复两次；⑤按照胰酶：蛋白为 1：50 的比例加入胰蛋白酶（Trypsin Gold, Promega, Fitchburg, WI, USA）进行消化，37℃水浴过夜。第二天 13000×g 30 min 4℃条件下离心收集肽段，通过 HLB 柱(Waters，Milford，MA)除盐，使用真空干燥仪抽干，在-80℃条件下保存。

2.4 LC-MS/MS 串联质谱分析

将酶解后的样品溶解于 0.1%的甲酸中，使用 BCA 试剂盒对肽段进行定量，将肽段浓度稀释为 0.5 μg/μL。取每个样品 4 μL 制备混合多肽样，按照说明书，使用高 pH 反相肽分离试剂盒(Thermo Fisher Scientific)进行分离。离心收集十份流出液（Fractions），使用真空干燥仪抽干后用 0.1%甲酸复溶。以样品 ：iRT 为 10 : 1 的体积比例加入 iRT 试剂(Biognosys, Switzerland)，以校准提取的肽峰的保留时间。为了进行分析，每个样品取 1 μg 肽段，使用 EASY-nLC1200 色谱系统(Thermo Fisher Scientific, USA)和 Orbitrap Fusion Lumos Tribrid 质谱仪(Thermo Fisher Scientific, USA)进行质谱分析并采集数据。

为了生成谱库，将分离得到的 10 个 Fractions 在 Data Dependent Acquisition(DDA)模式下进行了质谱分析。质谱数据采用高灵敏度模式采集。在 350-1500m/z 范围内获得了一个完整的质谱扫描，分辨率设置为 60,000。单个样品采用 Data Independent Acquisition(DIA)模式进行分析。采用具有 36 个窗口的 DIA 方法进行 DIA 采集。每 10 个样品后，对汇集肽进行单次 DIA 分析作为质量控制。

2.5 数据库搜索和 Label-free DIA 定量

将从液相-质谱联用采集到的原始数据（RAW 文件），导入 Proteome Discoverer（version 2.1, Thermo Scientific），和 Swiss-Prot 大鼠数据库（发布于 2019 年 5 月，包含 8086 个序列）进行比对，并将 iRT 序列添加到大鼠数据库中。然后将搜索结果导入 Spectronaut Pulsar(Biognosys AG, Switzerland)，进行处理和分析。通过将 MS2 中各自片段离子的峰面积相加，计算出肽的丰度。蛋白质强度由各自的肽丰度相加计算蛋白质丰度。

2.6 数据分析

每个样品均进行了 2 次技术重复，取平均值用于统计学分析。本实验将不同时间段的实验组样本进行自身前后对照，同时设置对照组排除生长发育的差异。将鉴定到的蛋白进行比较，筛选差异蛋白。差异蛋白筛选条件为：组间变化倍数（FC, Fold change）≥1.5 或≤0. 67，双尾非配对 *t* 检验分析的 *P* 值＜0.01。对筛选到的差异蛋白使用悟空平台（https://www.omicsolution.org/wkomic/main/）、Uniprot 网站（https://www.uniprot.org/）和 DAVID 数据库（https://david.ncifcrf.gov/）进行功能富集分析。并在 Pubmed 数据库（https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov）中检索已报道文献，从而对差异蛋白进行功能分析。

3. 结果与讨论

3.1 大鼠电子烟模型的特征

本实验在造模过程中对大鼠进行行为学观察。其中，对照组大鼠活动正常，饮食饮水正常。实验组与对照组相比，饮水量明显增加。同时本实验每隔 5 天记录一次大鼠体重（如图 2），观察到实验组大鼠体重的个体化差异明显增加。

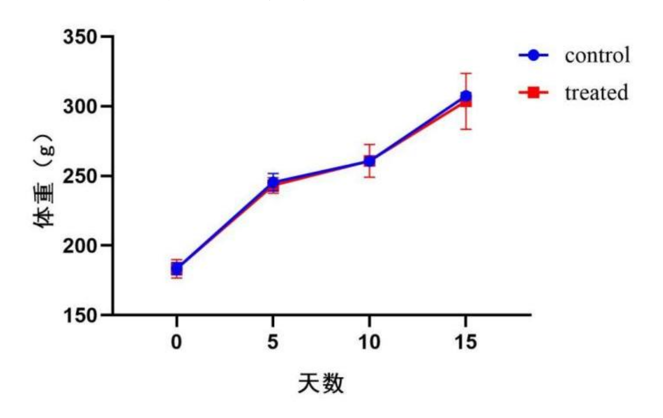


图 2 大鼠电子烟模型体重变化

3.2 大鼠电子烟模型尿液蛋白质组变化分析

（1）尿液蛋白质的鉴定

大鼠电子烟模型建立后，对 55 个尿液蛋白样品进行 LC-MS/MS 串联质谱分析。总共鉴定到 1093 个蛋白（特异性多肽≥2 个，蛋白水平 FDR<1%）。

（2）单只大鼠吸食电子烟进程中尿液蛋白质组变化分析

为了探究 6 只实验组大鼠的变化是否有一致性，我们对每一只大鼠单独进行了自身对照的尿液蛋白质组学分析，且均由不同时间点于第 0 天进行对比。筛选差异蛋白条件为：FC≥1.5 或≤0.67，双尾非配对 *t* 检验 *P*<0.05。差异蛋白筛选结果如表 1 所示。

表 1 单只大鼠吸食电子烟进程中差异蛋白表达的变化

分组	差异蛋白表达情况	对照组					实验组					
		Rat 1	Rat 2	Rat 3	Rat 4	Rat 5	Rat 1	Rat 2	Rat 3	Rat 4	Rat 5	Rat 6
Day3/Day0	差异蛋白数量	215	208	208	162	96	181	203	177	331	144	490
	上调的差异蛋白	89	83	82	71	59	51	87	58	127	60	199
	下调的差异蛋白	126	125	126	91	37	130	116	119	204	84	291
Day12/Day0	差异蛋白数量	401	257	214	275	217	260	265	188	336	173	533
	上调的差异蛋白	175	115	82	126	106	117	112	80	152	93	241
	下调的差异蛋白	226	142	132	149	111	143	153	108	184	80	292
Day15/Day0	差异蛋白数量	288	255	337	289	505	350	341	261	402	246	512
	上调的差异蛋白	124	141	130	104	312	125	153	104	163	151	214
	下调的差异蛋白	173	114	207	185	193	225	188	157	239	95	298
Day17/Day0	差异蛋白数量	395	264	289	320	191	266	283	199	290	475	518
	上调的差异蛋白	183	134	111	157	142	117	140	81	124	312	251
	下调的差异蛋白	212	130	178	163	49	149	143	188	166	163	267

为了更直观的观察 6 只实验组大鼠的变化的一致性程度，我们对实验组的 6 只大鼠在第 3、12、15、17 天同第 0 天自身前后比较筛选到的差异蛋白制作了韦恩图（如图 3）。从韦恩图呈现的结果中我们发现：大部分的差异蛋白都是个性化的，说明电子烟对大鼠造成的影响具有较强的个体化差异。

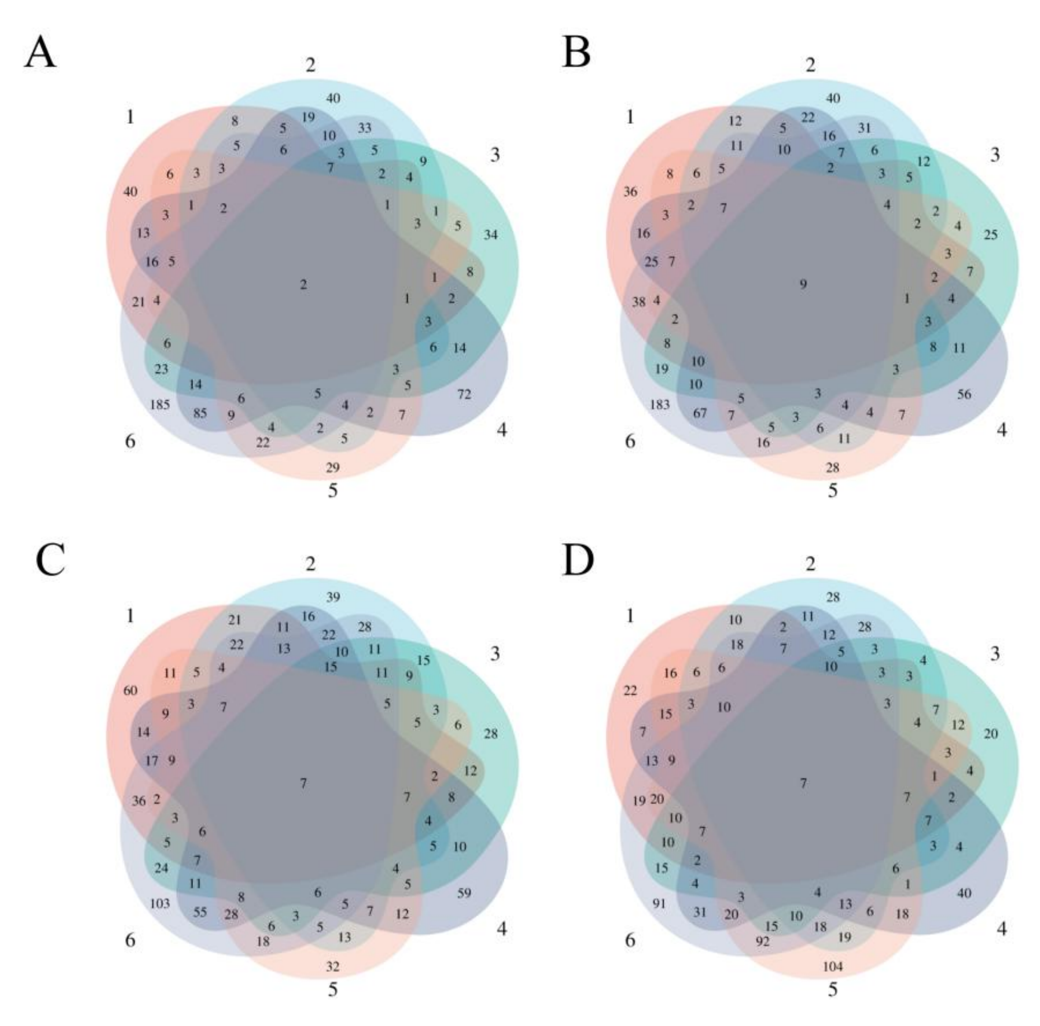


图 3 6 只实验组大鼠自身前后对照产生的差异蛋白韦恩图

为了验证不同时间点大鼠差异蛋白之间的关联性，我们将单只大鼠 D3、D12、D15、D17 同 D0 前后相对比，将 5 只及以上共同鉴定到的差异蛋白制作了韦恩图（如图 4）。其中，神经钙粘蛋白在四个时间点均被 5 只及以上的大鼠筛选到，且均呈现出下调趋势，还有 6 个差异蛋白在三个时间点均被 5 只及以上的大鼠筛选到，表现出了较为共性的差异。实验组 6 只大鼠的共有差异蛋白在不同天数的趋势如表 2 所示。

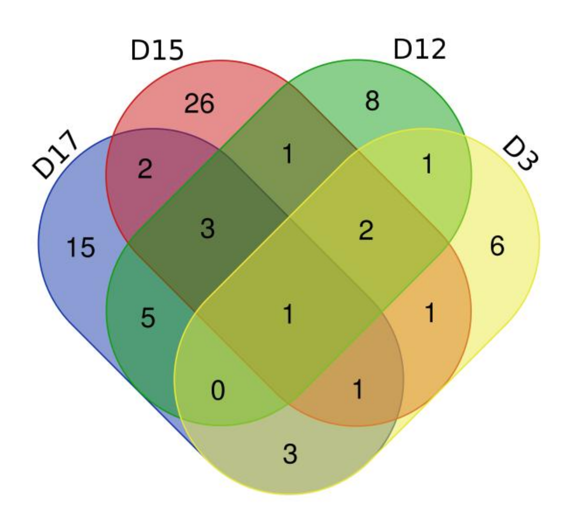


图 4 不同天数实验组 6 只大鼠的共有差异蛋白韦恩图

表 2 实验组 6 只大鼠的共有差异蛋白在不同天数的趋势

UniProt accession	Human ortholog	Protein name	Rat amount and trend				Related to OBP	Related to human disease
			D3	D12	D15	D17		
G3V803	P19022	Cadherin-2, Neural cadherin	5↓	6↓	5↓	5↓		[33]
P14668	P08758	Annexin A5		5↑	5↑	5↑ 1↓		[36]
Q99041	P49221	Protein-glutamine gamma-glutamyltransferase 4		1↑ 4↓	3↑ 2↓	2↑ 4↓		
P20761	-	Ig gamma-2B chain C region		4↑ 1↓	5↑	4↑ 1↓		
B3EY84	Q9NY56	Lipocalin 13, Odorant-binding protein 2A	5↓		5↑ 1↓	5↑	[30]	
P07151	P61769	Beta-2-microglobulin	4↑ 1↓	4↑ 1↓	6↑			
Q6IRS6	Q9UGM5	Fetuin-B	5↓	6↓	6↓			[28]
P27590	P07911	Uromodulin			5↑	5↑		
Q9JJH9	-	Alpha-2u globulin			5↑	5↑	[41]	
P0DMW0	P0DMV8	Heat shock 70 kDa protein 1A		4↑ 1↓		3↑ 2↓		[38]-[40]
M0RDH1	-	Odorant-binding protein 2B		5↑ 1↓		5↑	[34]	
Q68FP1	P06396	Gelsolin		5↑		5↑ 1↓		[37]
A0A0G2K230	Q14574	Desmocollin 3		5↑		5↑		[35]
P51635	P14550	Aldo-keto reductase family 1 member A1		5↑		4↑ 1↓		
Q64724	-	C-CAM4	5↓			1↑ 4↓		
P05545	-	Serine protease inhibitor A3K	5↓			5↓		
Q07936	P07355	Annexin A2	4↑ 1↓			2↑ 3↓		[32]
D4A9V5	-	Lysyl oxidase homolog		6↓	5↓			
P46413	P48637	Glutathione synthetase	5↓		5↓			
D4AE68	-	Guanine nucleotide-binding protein G(q) subunit alpha	3↑ 2↓	5↑ 1↓				
Q9QYU9	-	Odorant-binding protein 1F	5↓				[29]	
Q9JJI3	-	Alpha-2u globulin			6↑		[41]	

我们将六只实验组大鼠吸食电子烟 D3 与 D0 自身前后对照进行分析，发现 6 只实验组大鼠共同鉴定到的差异蛋白有 2 个，5 只实验组大鼠共同鉴定到的差异蛋白有 16 个。在和对照组自身前后比较产生的差异蛋白进行对比后，筛除重复的蛋白，产生了具有实验组特异共性的差异蛋白（详情见 Table S1.）。在产生的差异蛋白中，胎球蛋白 B(Fetuin-B)被 5 只大鼠共同鉴定到，均呈现显著下降的趋势，且在 D12、D15 的尿蛋白中均表现出显著的差异。有研究表明，胎球蛋白 B 是慢性阻塞性肺疾病（chronic obstructive pulmonary disease，COPD）的生物标志物[28]，体现了尿液蛋白质组的灵敏度。令人惊喜的是，我们还在 D3 显著变化的尿蛋白中观察到了气味结合蛋白(odorant binding protein, OBP)，包含 OBP1F 和 OBP2A，其中 OBP1F 主要在大鼠的鼻腺中表达[29]，OBP2A 也主要在人和大鼠的鼻子中转录[30]，这表明大鼠吸食气味竟然可以在尿液蛋白质组留下痕迹。目前 OBPs 的生理作用尚不完全清楚[31]，或许尿液蛋白质组可以在探究 OBPs 具体作用机制方面发挥一定的作用。除此之外，OBPs 出现在尿液蛋白质组这一现象，或许可以为嗅觉适应提供解释。而膜联蛋白 A2(Annexin A2)被广泛用作多种肿瘤的标志物[32]。除此之外，László ZI 等人的研究表明，神经钙粘蛋白(Neural cadherin)是大脑发育过程中最重要的细胞粘附分子之一，在神经元形成、神经元增殖、分化和迁移、轴突引导、突触发生和突触维持中起着重要作用[33]。

我们同样将实验组的六只大鼠在 D12 同 D0 天自身前后比较进行分析。6 只实验组大鼠共同鉴定到的差异蛋白有 9 个，5 只实验组大鼠共同鉴定到的差异蛋白有 18 个。在和对照组单只大鼠自身前后比较产生的差异蛋白进行对比后，筛除重复的蛋白，产生了具有实验组特异共性的差异蛋白（详情见 Table S2.）。在 6 只大鼠产生的差异蛋白中，OBP2B 也都表现出了较为一致的上调。和 OBP2A 不同的是，OBP2B 主要表达于生殖器官，弱表达于鼻、肺等呼吸系统的器官中[34]。有研究表明，Desmocollin 3 是细胞黏附和桥粒形成所必须的蛋白质，可能增强血管生成与鼻咽癌的转移，被认为是一些癌症的生物标志物，如非小细胞肺癌[35]。同样有研究表明，Annexin A5 可能影响肿瘤疾病、肺纤维化及肺损伤等病理现象的发生与发展，也作为生物标志物应用于肿瘤和哮喘等疾病的研究中，还可能促进喉癌、鼻咽癌的发生发展[36]。我们同样筛选出了尼古丁的代谢物可替宁的重要细胞靶点：凝胶蛋白(Gelsolin)，尼古丁可能通过凝胶蛋白影响肿瘤转化和转移的基本过程，如迁移和凋亡[37]。而热休克蛋白（Heat shock protein）被报道是受香烟烟雾影响的主要标志物，参与细胞周期和细胞死亡和炎症的信号通路[38]-[40]。

将 D15 同 D0 比较时，6 只实验组大鼠共同鉴定到的差异蛋白有 7 个，5 只实验组大鼠共同鉴定到的差异蛋白有 45 个。在和对照组自身前后比较产生的差异蛋白进行对比后，筛除重复的蛋白，产生了具有实验组特异共性的差异蛋白（详情见 Table S3.）。Ponmanickam P 等人的研究表明，α-2u 球蛋白可能作为包皮腺疏水性气味的载体，而包皮腺在大鼠产生信息素交流的嗅觉信号中起重要作用，因此α-2u 球蛋白很可能参与大鼠嗅觉信号的传输过程[41]。

最后我们对实验组的 6 只大鼠在第 17 天同第 0 天自身前后比较筛选到的差异蛋白进行分析，其中 6 只实验组大鼠共同鉴定到的差异蛋白有 7 个，5 只实验组大鼠共同鉴定到的差异蛋白有 42 个。在和对照组自身前后比较产生的差异蛋白进行对比后，筛除重复的蛋白，产生了具有实验组特异共性的差异蛋白（详情见 Table S4.）。

（3）实验组自身前后对照产生差异蛋白的功能分析

为了探究这些差异蛋白的功能，我们利用 DAVID 数据库对 5 只及以上实验组大鼠共同筛选出的差异蛋白进行了生物学通路的功能分析（详见 Table S5.）。其中有 32 个生物学过程被两个时间点的差异蛋白富集到。

我们还对 5 只及以上实验组大鼠共同鉴定到的差异蛋白进行信号通路分析（如表 3）。其中有两条信号通路被两个时间点共同富集到。包括军团病(Legionellosis)和铁死亡

(Ferroptosis)。军团病引发的肺炎为机体带来的伤害可能与吸食电子烟对机体的影响机制相似。M. Yoshida 等人的研究表明，吸烟可以诱导上皮细胞发生铁死亡，且这一信号通路参与慢性阻塞性肺病的发病过程[42]。除此之外，我们还富集到许多与呼吸系统疾病相关的信号通路，如 Apelin 信号通路[43][44]、叶酸生物合成通路[45]、花生四烯酸代谢[46]等。Apelin 是 G 蛋白偶联受体 APJ 的内源性配体[43]，Apelin/APJ 通路与呼吸系统疾病的发生密切相关，靶向 apelin/APJ 系统可能是呼吸系统疾病的一种有效治疗途径[44]。而 Stanisławska-Sachadyn A 等人的研究表明，吸烟者的血清叶酸浓度高于健康对照组，推测叶酸的合成与肺癌风险增加相关[45]。在富集到的 23 条信号通路中，有多条与免疫系统有着密切的关系，还有两条和心肌病、动脉粥样硬化直接相关，因此我们推测吸食电子烟可能会对大鼠的免疫系统、心血管系统造成影响。值得重视的是，我们还富集到了两条与化学致癌相关的信号通路，包括化学致癌作用-DNA 加合物(Chemical carcinogenesis - DNA adducts)与化学致癌作用-活性氧(Chemical carcinogenesis - reactive oxygen species)，或许可以验证前人的研究结果：电子烟的烟雾包含着可致癌的化学物质[47]。

表 3 5 只及以上实验组大鼠在吸食电子烟进程中产生的共有差异蛋白富集的信号通路。

Pathway	P-Value				Related to human disease
	D3	D12	D15	D17	
GnRH secretion	4.20E-02				
Apelin signaling pathway	8.80E-02				[43][44]
Antigen processing and presentation		4.00E-03			
Estrogen signaling pathway		9.40E-03			
Human immunodeficiency virus 1 infection		2.70E-02			
Legionellosis		6.30E-02		9.30E-02	
Longevity regulating pathway - multiple species		6.90E-02			
Renin secretion		7.80E-02			
Arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy		8.30E-02			
Folate biosynthesis			1.10E-03		[45]
Metabolism of xenobiotics by cytochrome P450			6.90E-03		
Chemical carcinogenesis - DNA adducts			6.90E-03		
Arachidonic acid metabolism			8.00E-03		[46]
Metabolic pathways			3.80E-02		
Chemical carcinogenesis - reactive oxygen species			5.70E-02		
Ferroptosis			6.80E-02	6.80E-02	[42]
Mineral absorption				4.00E-03	
Glycolysis / Gluconeogenesis				5.60E-03	
Phenylalanine metabolism				3.00E-02	
Histidine metabolism				4.10E-02	
Lipid and atherosclerosis				4.70E-02	
beta-Alanine metabolism				5.10E-02	
Tyrosine metabolism				6.20E-02	

4. 结论

本研究通过构建大鼠电子烟模型，利用单只大鼠前后自身对照的方式，探究了大鼠在吸食电子烟前后的尿液蛋白质组学变化。结果表明，在相同的条件下吸食电子烟后，大鼠产生

的差异蛋白具有较强的个体差异性。我们在大鼠吸食电子烟第 3 天产生的差异蛋白中，发现 6 只实验组大鼠前后对照共同鉴定到了 COPD 的生物标志物胎球蛋白 B，以及被认定为多种肿瘤标志物的膜联蛋白 A2 等，体现了尿液蛋白质组的灵敏度。本研究还在多个时间点发现了在嗅上皮有表达的气味结合蛋白在尿液蛋白质组中出现，并且显著上调，这可能为解释嗅觉适应提供线索。而吸烟后嗅觉上皮中表达的气味结合蛋白如何在尿液中结束仍有待阐明。在疾病方面，我们在产生的差异蛋白和富集到的信号通路中都发现了吸食电子烟影响免疫系统、心血管系统、呼吸系统等的证据，为进一步探究电子烟对人体的作用机制提供线索。

参考文献

[1] http://www.xinhuanet.com/politics/2019-11/06/c_1125199903.htm

[2] Bold KW, Kong G, et al. Reasons for trying E-cigarettes and risk of continued use. *Pediatrics.* 2016, 138(3):e20160895.

[3] Pipe AL, Mir H. E-Cigarettes Reexamined: Product Toxicity. *Can J Cardiol.* 2022, 38(9):1395-1405.

[4] Cheng KA, Nichols H, McAdams HP, et al. Washington L. Imaging of Smoking and Vaping Related Diffuse Lung Injury. *Radiol Clin North Am.* 2022, 60(6):941-950.

[5] Fetterman JL, Keith RJ, Palmisano JN, et al. Alterations in vascular function associated with the use of combustible and electronic cigarettes. *J Am Heart Assoc*. 2020, 9(9): e014570

[6] Lee WH, Ong SG, Zhou Y, et al. Modeling cardiovascular risks of e-cigarettes with human-induced pluripotent stem cell-derived endothelial cells. *J Am Coll Cardiol*. 2019, 73(21): 2722-2737.

[7] Espinoza-derout J, Shao X M, Bankole E, et al. Hepatic DNA damage induced by electronic cigarette exposure is associated with the modulation of NAD+/PARP1/SIRT1 axis. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2019, 10: 320.

[8] Lee HW, Park SH, Weng MW, et al. E-cigarette smoke damages DNA and reduces repair activity in mouse lung, heart, and bladder as well as in human lung and bladder cells. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2018, 115(7): E1560-E1569.

[9] Martin EM, Clapp PW, Rebuli ME, et al. E-cigarette use results in suppression of immune and inflammatory-response genes in nasal epithelial cells similar to cigarette smoke. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2016, 311(1): L135-L144.

[10] Ballbè M, Fu M, Masana G, et al. Passive exposure to electronic cigarette aerosol in pregnancy: A case study of a family. *Environ Res*. 2022, 8:114490.

[11] Aslaner DM, Alghothani O, Saldaña TA, et al. E-cigarette vapor exposure in utero causes long-term pulmonary effects in offspring. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2022 Oct 11. doi: 10.1152/ajplung.00233.2022. Epub ahead of print. PMID: 36218276.

[12] Ballbè M, Martínez-Sánchez JM, Sureda X, et al. Cigarettes vs. e-cigarettes: Passive exposure at home measured by means of airborne marker and biomarkers. *Environ Res*. 2014, 135:76-80.

[13] Kyle Strimbu,Jorge A Tavel. What are biomarkers? *Current Opinion in HIV and AIDS*. 2010, 5(6).

[14] Gerszten Robert E,Wang Thomas J. The search for new cardiovascular biomarkers.*Nature*. 2008, 451(7181).

[15] Zou Lili, Sun Wei. Human urine proteome: a powerful source for clinical research .*Adv Exp Med Biol.* 2015, 845:31-42.

[16] Wu J, Li X, Gao Y, et al. Early Detection of Urinary Proteome Biomarkers for Effective Early Treatment of Pulmonary Fibrosis in a Rat Model. *Proteomics Clin Appl*. 2017, 11(11-12).

[17] Qin W, Li L, Gao Y, et al.Urine Proteome Changes in a TNBS-Induced Colitis Rat Model. *Proteomics Clin Appl.* 2019, 13(5):e1800100.

[18] Wu J, Zhang J, Gao Y, et al.Urinary biomarker discovery in gliomas using mass spectrometry-based clinical proteomics. *Chin Neurosurg J.* 2020, 6:11.

[19] Hao Y, Reyes LT, Cheng F, et al.Changes of protein levels in human urine reflect the dysregulation of signaling pathways of chronic kidney disease and its complications. *Sci Rep*. 2020, 10(1):20743.

[20] Ni M, Zhou J, Zhu Z, et al.A Novel Classifier Based on Urinary Proteomics for Distinguishing Between Benign and Malignant Ovarian Tumors. *Front Cell Dev Biol*. 2021, 9:712196.

[21] Davies JC, Carlsson E, Midgley A, et al. A panel of urinary proteins predicts active lupus nephritis and response to rituximab treatment. *Rheumatology (Oxford)*. 2021, 60(8):3747-3759.

[22] Meng W, Xu D, Gao Y, et al.Changes in the urinary proteome in rats with regular swimming exercise. *Peer J*. 2021, 9:e12406

[23] Virreira Winter S, Karayel O, Strauss MT, et al. Urinary proteome profiling for stratifying patients with familial Parkinson's disease. *EMBO Mol Med.* 2021, 13(3):e13257.

[24] Virreira Winter, S., et al., Urinary proteome profiling for stratifying patients with familial Parkinson's disease. *EMBO Mol Med*. 2021, 13(3): p. e13257.

[25] Watanabe, Y., et al., Urinary Apolipoprotein C3 Is a Potential Biomarker for Alzheimer's Disease. *Dement Geriatr Cogn Dis Extra*. 2020, 10(3): p. 94-104.

[26] Huan Y, Wei J, Gao Y, et al.Label-Free Liquid Chromatography-Mass Spectrometry Proteomic Analysis of the Urinary Proteome for Measuring the Escitalopram Treatment Response From Major Depressive Disorder. *Front Psychiatry*. 2021, 12:700149.

[27] Meng W, Huan Y, Gao Y. Urinary proteome profiling for children with autism using data-independent acquisition proteomics. *Transl Pediatr.* 2021, 10(7):1765-1778.

[28] Diao WQ, Shen N, Du YP, et al. Fetuin-B (FETUB): a Plasma Biomarker Candidate Related to the Severity of Lung Function in COPD. *Sci Rep*. 2016, 6:30045.

[29] Aragona P, Puzzolo D, Micali A, et al. Morphological and morphometric analysis on the rabbit conjunctival goblet cells in different hormonal conditions. *Exp Eye Res*. 1988, 66:81–88

[30] L. Briand, C. Eloit, C. Nespoulous, et al. Evidence of an odorant-binding protein in the human olfactory mucus: location, structural characterization, and odorant-binding properties. *Biochemistry.* 2002, 41(23):7241-7252

[31] Redl B, Habeler M. The diversity of lipocalin receptors. *Biochimie.* 2022, 192:22-29.

[32] Huang Y, Jia M, Yang X, et al. Annexin A2: The diversity of pathological effects in tumorigenesis and immune response. *Int J Cancer.* 2022, 151(4):497-509.

[33] László ZI, Lele Z. Flying under the radar: CDH2 (N-cadherin), an important hub molecule in neurodevelopmental and neurodegenerative diseases. *Front Neurosci.* 2022, 16:972059.

[34] Lacazette E, Gachon AM, Pitiot G. A novel human odorant-binding protein gene family resulting from genomic duplicons at 9q34: differential expression in the oral and genital spheres. *Hum Mol Genet.* 2000, 9(2):289-301.

[35] Ezzat Nel-S, Tahoun N. The role of Napsin-A and Desmocollin-3 in classifying poorly differentiating non-small cell lung carcinoma. *J Egypt Natl Canc Inst.* 2016, 28(1):13-22.

[36] Xi Zhang, QingYu Meng, Jian Jing . Human Annexin A5: from Biomarkers to Therapeutic Candidates. *Chinese Journal of Biochemistry and Molecular Biol.* 2022, 38(10): 1311-1321.

[37] Nowak JM, Klimaszewska-Wiśniewska A, Izdebska M, et al. Gelsolin is a potential cellular target for cotinine to regulate the migration and apoptosis of A549 and T24 cancer cells. *Tissue Cell.* 2015, 47(1):105-14.

[38] K. G´ al, ´ A. Cseh, B. Szalay, et al. Effect of cigarette smoke and dexamethasone on Hsp72 system of alveolar epithelial cells. *Cell Stress Chaperones.* 2011, 16:369–378.

[39] A. Hulina-Tomaˇskovic, I.H. Heijink, M.R. Jonker, et al. Pro-inflammatory effects of extracellular Hsp70 and cigarette smoke in primary airway epithelial cells from COPD patients. *Biochimie.* 2019, 156:47–58.

[40] M.H. Parseghian, S.T. Hobson, R.A. Richieri. Targeted heat shock protein 72 (HSP72) for pulmonary cytoprotection. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 2016, 1374:78.

[41] Ponmanickam P, Archunan G. Identification of alpha-2u globulin in the rat preputial gland by MALDI-TOF analysis. *Indian J Biochem Biophys.* 2006, 43(5):319-22.

[42] M. Yoshida, S. Minagawa, J. Araya, et al. Involvement of cigarette smokeinduced epithelial cell ferroptosis in COPD pathogenesis. *Nat. Commun.* 2019, 10:1–14.

[43] Tatemoto K, Hosoya M, Habata Y, et al. Isolation and characterization of a novel endogenous peptide ligand for the human APJ receptor. *Biochem Biophys Res Commun.* 1998, 251(2):471–476.

[44] Yan J, Wang A, Cao J, et al. Apelin/APJ system: an emerging therapeutic target for respiratory diseases. *Cell Mol Life Sci.* 2020, 77(15):2919-2930.

[45] Stanisławska-Sachadyn A., Borzyszkowska J., Krzemiński M., et al. Folate/homocysteine metabolism and lung cancer risk among smokers. *PLoS ONE.* 2019, 14:e0214462.

[46] Giudetti AM, Cagnazzo R. Beneficial effects of n-3 PUFA on chronic airway inflammatory diseases. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* 2012, 99(3-4):57-67.

[47] Eshraghian EA, Al-Delaimy WK. A review of constituents identified in e-cigarette liquids and aerosols. *Tob Prev Cessat.* 2021, 10;7:10.

作者贡献声明：

高友鹤：提出研究思路，设计研究方案、修订论文最终版本；

刘禹卿：进行实验、数据采集、分析、论文起草；

沈梓芸：进行实验；

赵晨阳：数据分析。